



TITLE:

# EGFR阻害薬Gefitinibおよび ErlotinibによるeIF2 $\alpha$ のリン酸化に 関する研究( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

小山, 智志

---

CITATION:

小山, 智志. EGFR阻害薬GefitinibおよびErlotinibによるeIF2 $\alpha$ のリン酸化に関する研究. 京都大学, 2016, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19654>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-03-22に公開

京都大学	博士（薬学）	氏名	小山 智志
論文題目	EGFR阻害薬GefitinibおよびErlotinibによるeIF2αのリン酸化に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>GefitinibおよびErlotinibなどのEGFR阻害薬は、非小細胞肺癌の治療に使用される分子標的薬であるが、重篤な副作用として間質性肺疾患が報告されている。しかしながら、EGFR阻害薬による間質性肺疾患の発症機序は未だ不明な点が多い。肺が障害を受けⅠ型肺胞上皮細胞が脱落した際、Ⅱ型肺胞上皮細胞が増殖しⅠ型へと分化することで肺胞の修復を担うと報告されていることから、Ⅱ型肺胞上皮細胞に対するEGFR阻害薬の影響を明らかにすることは、EGFR阻害薬による肺障害の機序の解明において重要であると考えられる。一方、いくつかの肺障害の機序の一つに小胞体ストレスが関与することが報告されている。以上を踏まえ、申請者はⅡ型肺胞上皮モデル細胞に対してEGFR阻害薬が及ぼす小胞体ストレスに関連したシグナルへの影響について検討した結果、以下の新知見を得た。</p> <p>第一章 GefitinibおよびErlotinibによるeIF2αのリン酸化と肺胞上皮細胞の増殖抑制</p> <p>GefitinibおよびErlotinibが小胞体ストレスを引き起こすか否か検討するため、Ⅱ型肺胞上皮モデル細胞A549に両薬剤を処置し、小胞体ストレス関連遺伝子のmRNA発現量の変動を観察した。これらEGFR阻害薬は、<i>HRD1</i>、<i>SEL1</i>、<i>Bip</i>のmRNA発現を誘導しなかったのに対し、<i>PARK2</i>、<i>CHOP</i>のmRNA発現を誘導した。これらのことから<i>HRD1</i>、<i>SEL1</i>、<i>Bip</i>の上流シグナル分子であり、小胞体ストレスセンサー分子であるIRE1およびATF6は活性化していないことが示唆された。次に、<i>PARK2</i>および<i>CHOP</i>の上流シグナルであるPERK/eIF2α/ATF4経路の活性化を検討したところ、eIF2αのリン酸化が処置後3時間で見られ、その後ATF4の誘導が認められた。一方、小胞体ストレスセンサー分子PERKの活性化は認められなかった。以上のことからGefitinibおよびErlotinibはA549において小胞体ストレスを惹起しないと考えられた。</p> <p>次にGefitinibおよびErlotinibによる細胞死および増殖抑制について検討した。GefitinibおよびErlotinibはA549においてCaspase-3の活性化や細胞死を惹起しなかったが、Cyclin-D1の発現低下と増殖抑制を引き起こした。siRNAによってEGFRを発現抑制した際も、GefitinibおよびErlotinibによるeIF2αのリン酸化とCyclin-D1の発現低下が観察されたことから、これらEGFR阻害薬によるeIF2αのリン酸化はEGFR非依存적であることが示唆された。またeIF2αのリン酸化を抑えるTauroursodeoxycholic Acid（TUDCA）は、GefitinibおよびErlotinibによるCyclin-D1の発現低下および増殖抑制を軽減した。一方、EGFR阻害薬感受性細胞であるPC-9に</p>			

両薬剤を処置した結果、ともに細胞死を惹起し、eIF2 $\alpha$ のリン酸化も観察された。しかしながら、TUDCAはPC-9においてGefitinibおよびErlotinib誘発細胞死を抑制しなかったことから、TUDCAの投与はGefitinibおよびErlotinibの抗がん作用には影響しないことが示唆された。

## 第二章 GefitinibおよびErlotinibによるeIF2 $\alpha$ リン酸化機序の解析

第一章より、GefitinibおよびErlotinibによるeIF2 $\alpha$ のリン酸化がII型肺胞上皮細胞の増殖抑制に関与することが示唆された。そこで、eIF2 $\alpha$ リン酸化作用がどのような機序で起きているか検討した。eIF2 $\alpha$ リン酸化酵素であるPERK、GCN2およびPKRをsiRNAにより発現抑制した際の影響を検討した結果、いずれのsiRNAによってもGefitinibおよびErlotinibによるeIF2 $\alpha$ リン酸化作用は消失せず、さらに全てのsiRNAを同時に導入した場合においても同様に消失しなかった。次にeIF2 $\alpha$ の脱リン酸化過程について検討するため、非選択的脱リン酸化阻害剤Okadaic Acidを前処置した条件下で両薬剤を処置したところ、両薬剤によるeIF2 $\alpha$ リン酸化作用は消失した。しかしながら、eIF2 $\alpha$ 脱リン酸化阻害剤であるSalubrinalを処置し同様の検討を行ったところ、GefitinibおよびErlotinibによるeIF2 $\alpha$ のリン酸化作用は抑制されなかった。さらにeIF2 $\alpha$ の脱リン酸化を担うProtein Phosphatase 1 (PP1) に対する直接の阻害作用を検討したところ、GefitinibおよびErlotinibはPP1の脱リン酸化活性を阻害しなかった。これらの結果より、PP1に対する直接阻害以外の形式で、GefitinibおよびErlotinibがeIF2 $\alpha$ の脱リン酸化過程を阻害している可能性が示唆された。

以上、申請者は、EGFR阻害薬であるGefitinibおよびErlotinibによるEGFR非依存的なeIF2 $\alpha$ のリン酸化が、Cyclin-D1の減少を介してA549の増殖抑制に関与していることを見出した。また、eIF2 $\alpha$ のリン酸化を抑制するTUDCAが、両薬剤によるA549の増殖抑制を軽減するのに対し、PC-9における細胞死に対しては保護的に作用しないことを示した。そして、これらEGFR阻害薬によるeIF2 $\alpha$ リン酸化レベルの上昇がeIF2 $\alpha$ の脱リン酸化過程を標的とする作用であることを見出した。本研究の成果は、EGFR阻害薬によるII型肺胞上皮細胞の増殖抑制の機序にeIF2 $\alpha$ が関与していることを示唆するものであり、これを標的とする間質性肺疾患の予防法の開発に有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

ゲフィチニブおよびエルロチニブは、EGFR阻害薬として非小細胞肺がんの使用される分子標的薬である。重篤な有害反応として間質性肺疾患が挙げられるが、その発症機序は不明な点が多かった。一方、肺が障害を受けたとき、Ⅱ型肺胞上皮細胞が増殖しⅠ型へと分化することで肺胞の修復を行うことが報告されており、申請者はゲフィチニブ・エルロチニブによる肺障害機構に関して、Ⅱ型肺胞上皮モデル細胞A549を用いた解析を行い、以下の新知見を得た。

ゲフィチニブおよびエルロチニブは、翻訳抑制に関与するシグナル分子の一つeIF2 $\alpha$ をEGFR非依存的にリン酸化し、eIF2 $\alpha$ のリン酸化はCyclinD-1を介した増殖抑制に関与していることを明らかにした。また、タウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) は、ゲフィチニブおよびエルロチニブによって惹起されるeIF2 $\alpha$ のリン酸化を抑制し、両薬剤による増殖抑制を軽減することを見出した。一方、EGFR阻害薬感受性細胞PC-9においては、TUDCAは両薬剤により惹起される細胞死に対して保護的に作用しないことを明示した。さらに、eIF2 $\alpha$ のリン酸化レベルの上昇は、脱リン酸化過程を標的とすることを明らかにした。

以上の研究は、EGFR阻害薬によるⅡ型肺胞上皮細胞の増殖抑制にeIF2 $\alpha$ が関与する可能性を示しており、EGFR阻害薬により惹起される間質性肺疾患の新たな治療法開発に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降